



TITLE:

蛋白の分子量に就て

AUTHOR(S):

近藤, 金助

CITATION:

近藤, 金助. 蛋白の分子量に就て. 化学研究所講演集 1936, 6: 116-123

ISSUE DATE:

1936-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/73575>

RIGHT:

蛋白質の分子量に就て

農學博士 近藤金助

A 緒言

蛋白質は動物であれ植物であれ凡そ地球上にて生命を有するものゝからだを組み立てゝ居る主要なる物質である。のみならず蛋白質は此等の生物體內にて生命現象が営まれる所には必ず存在して居つて生命作用の遂行に當つては極めて樞要なる役目を果して居るのである。

即ち地球上に於て生命の發生は遠い過去にあつたことでありませうが、此の生命を私等は遠く祖先から受け繼いで現在生存し、更に之を我が子孫に永遠に傳へることが出来るのは實に蛋白質が存在する爲めであると云ひ得るのである。

之を思へば吾人は貴き生命をば實に蛋白質に托して生存して居るのである。

斯くの如く蛋白質は人生にとつて極めて大切にして有意義なものであるだけに其の性質其の本質を見窮めて生命作用の眞髓を明白にしようと志した化學者は過去に於ても又現在に於ても少くないのである。蓋し蛋白質の性質と行爲が氷解すれば生命作用の眞相に就ても亦明解し得られることゝなつて、人生へもたらす福利は精神的にも又物質的にも絶大なるものがあるからである。

斯かる希望のもとに多數の化學者が大なる苦心と努力とを惜しまずして研究を續けたにも拘はらず、又其の努力と苦心とは他の物質の研究者に比べて遙かに大であつたと信ぜられるにも拘はらず、今尚ほ蛋白質に關しては混沌として不明な所が多いのは研究を進めるのに當つて未だ突破し難い關所が一つ横たはつて居るからである。其の關所は蛋白質の分子量決定といふ難問題であつて、此の難問題を解決する爲めにどれだけの苦心が拂はれたか、而して其の結果はどれだけの知識を吾々にもたらしたか、此等の點に就て以下記述する次第である。

B 分子量の測定方法

蛋白質の如き大分子化合物の分子量を測定するには、一般有機化合物の場合とはちがつて別な方法を採用しなければならないことは云ふ迄もない。で現在蛋白質の分子量を決定する爲めに採用されて居る主なる方法を掲げてみれば大略次の六通りとなるのである。

1. 滲透壓法

蛋白質溶液の滲透壓測定値から蛋白質の分子量を算出する方法であつて、今 Prof. Sørensen が採用した算出方法を要示すれば次の通りである。Prof. Sørensen は蛋白質溶液の滲透壓は蛋白質の濃度に比例することを實驗して蛋白質溶液の滲透壓と蛋白質の濃度との關係を誘導して次の式を得

たのである。

$$P = R \cdot T \cdot \frac{E}{n} \dots\dots\dots (a)$$

P: 滲透壓 R: 氣體恒數 T: 絶對溫度

E: Dispersion medium 1 cc. につき Protein-N の mg-equivalent の數

n: 1 分子の蛋白中にある窒素の原子數, 従つて $\frac{E}{n}$ は蛋白の濃度を示すこととなりて此
の n の數値を見出し得ば蛋白の分子量は算出することが出来るのである。

2. 超速圓心力應用沈降法

之は専ら Prof. The Svedberg 及びその一門の人々が採用する方法であつて Prof. Svedberg は蛋白溶液に超速圓心力を應用して蛋白粒子の沈降と彌散との間の平衡を保たせた時の状態を熱力學的に考察して次の式を誘導して分子量 (M) を算出したのである。

$$M = \frac{2 R \cdot T \ln \frac{C_1}{C_2}}{W^2(1-V\rho)(x_1-x_2)(x_1+x_2)} \dots\dots\dots (b)$$

M: 分子量

C_1, C_2 : 超速圓心器の中心から x_1 cm, x_2 cm の 2 點に於ける溶液の濃度を C_1 及び C_2 となす。

W: 圓心器の廻轉速度 V: 溶質の比容 ρ : 溶媒の密度

3. 彌散係數測定法

蛋白溶液について彌散係數を測定すれば Einstein 氏の彌散式によつて蛋白分子の半徑(r)がわかる。

$$D = \frac{R \cdot T}{N} \cdot \frac{1}{6\pi r \eta} \dots\dots\dots (c)$$

D: 彌散係數 N: Avogadro の恒數 π : 圓周率

η : 溶媒の粘度 r: 蛋白分子の半徑

そこで r の値が D の實測の結果上式によつて算出し得れば, 次の式によつて分子量を算出することが出来るわけである。

$$M = \frac{4}{3} \pi r^3 g N \dots\dots\dots (d)$$

g: 蛋白の比重

4. 濾過又は透過法

蛋白溶液を濾過又は透過せしめるに當つて, 濾過面の濾過孔の大きさを豫め測定して置いて濾過又は透過した蛋白粒子の大きさを推算し, 然る後其の分子量を算出する方法である。

5. 蛋白中の特殊成分を定量する方法

蛋白質中の成分、例へばトリプトファン又は硫黄の如きものを定量し次式を用ゐて蛋白質の分子量を算出するのである。

$$M = \frac{(\text{Atomic weight of Constituent}) \times 100}{\% \text{ of Constituent in protein}} \dots\dots\dots (c)$$

6. 蛋白質が酸又は鹽基と結合する能力を測定する方法

一般蛋白質ならば酸又は鹽基と結合する能力或はヘモグロビン又はヘモシアニンの如き蛋白質ならば、酸素或は一酸化炭素と結合する能力を測定した結果から蛋白質の分子量を算出するのである。

C 測定結果

蛋白質の分子量を測定する方法は大略以上の六通りであるが、1, 2, 3に示した方法によつて測定が行はれる迄は蛋白質の分子量に就て報告せられたものは、何れも専門學者の注意を惹き得る丈の確からしさがなかつたのである。斯かる時に恰も曉天の星の如くに蛋白質の研究は斯くの如き方法にて斯くの如き周到なる注意のもとに行はるべきであるとして實に模範的な又指導的な業績を發表されたのが、Prof. Sørensen⁽¹⁾であつて同時に附隨的ではあるが、前節の1に於て示した(a)式に従つて Ovalbumin の分子量を算出されたのである。

その時は溶媒 1 cc に就て蛋白質窒素 1 mg equivalent が働く滲透壓を π にて表はしたのである。然らば $\pi = \frac{R \cdot T}{n}$ となるが故に π の値を見出せば n の値がわかつて結局 Ovalbumin の分子量も亦算出せられることになるのである。 π 即ち滲透壓は溶液の水素イオン濃度、其の他蛋白質の濃度等によつて變動するのであるが Prof. Sørensen は Ovalbumin 溶液の滲透壓測定結果の多數のうちから $\pi = 65$ cm (水壓)と定められて之を $\pi = \frac{R \cdot T}{n}$ に代入して n の値を算出されたのである。

$$\pi = 65$$

$$R \cdot T = 24685$$

然らば n は 380 となる。

そこで n は Ovalbumin 1 分子中にある窒素の原素數であり又 Ovalbumin の中にある窒素の含率は 15.50 % であるから Ovalbumin の分子量は次の計算の如くに約 34000 となるのである。

$$380 \times 14.01 \times \frac{100}{15.50} = \text{約 } 34000$$

斯くして Ovalbumin の分子量 34000 といふことが報ぜられたのである。Prof. Sørensen が以上の如くに Ovalbumin の分子量は約 34000 であるといふ計算をされるに當つて用ひられた

(1) Sørensen: Z. physiol. Chem. **106** (1919) 1; Comptes-Rendus des travaux du Laboratoire de Carlsberg, **12** (1915—17) 262.

實驗數値については更に吟味しなければならない點もあるが（それについては後述することとしよう）斯學界でもそんなことには注意を拂はずに、唯々其の實驗が周到的で又模範的であつたが爲めにか Ovalbumin の分子量が約 34000 であるといふ計算に對して専門學者も亦信を置いたのである。

次で Prof. Svedberg⁽²⁾ は獨特の方法即ち超速遠心力應用沈降法によつて Ovalbumin の分子量を測定した所が約 34500 といふ結果を得た。之が偶然にも Prof. Sørensen が報告した Ovalbumin の分子量 34000 と相接近して居る所から Prof. Svedberg は自信を得て同氏の方法を他の蛋白にも應用して蛋白の分子量並に其の形狀を測定したのである。其れによれば單一分散性の蛋白は分子量の大きさに應じて 2 群に分ち得べく第 1 群のものは食用蝸牛 (*Helix pomatia*) 及びカブトガニ (*Limulus polyphemus*) の血液のうちにある Haemocyanine であつて分子量は何れも 100 萬以上である。而して第 2 群のものは第 1 表に示す通りに分子量の大きさに應じて 4 組に分ち得るが其の分子量は 34500 の 1, 2, 3 及び 6 倍であると Prof. Svedberg は云ふのである。

第 1 表 蛋白質の分子量
(Prof. Svedberg による)

Remarks	Origin	Molecular weight	Radius of Molecule A°
I Group			
Helix-haemocyanin	Helix-blood	5,000,000	12.0
Limulus-haemocyanin	Limulus-blood	2,000,000	Non-Spheroidal
II Group			
1. Class			
Bence-Jones albumin	Urine	35000 = 1.01 × 34500	21.8
Ovalbumin	Egg-white	34500 = 1.00 × 34500	21.7
2. Class			
Haemoglobin	Horse-blood	68000 = 1.97 × 34500	Non-Spheroidal
Serum-albumin	"	37500 = 1.96 × 34500	"
3. Class			
Serum-globulin	Horse-blood	103800 = 3.03 × 34500	"
4. Class			
Amandin	Almond	208000 = 6.04 × 34500	39.4
Edestin	Hempseed	208000 = 6.04 × 34500	39.4
Exelsin	Brazil nut	212000 = 6.15 × 34500	39.6
Legumin	Vetch	208000 = 6.04 × 34500	39.6

斯くの如く第 2 群の蛋白は何れも 34500 の倍數であることは眞に興味あることであるが、又

(2) Svedberg; J. Amer. Chem. Soc. 48 (1926) 3.81 Koll.-Z. 51 (1930) 10.
J. Physique et Radium, VII, T. II, N° 7 (1931) 227.

一面から見れば第2群に屬する蛋白質は多數にある筈であるが、それが何れも34500の倍數を分子量に持つが如くに整然たるものであらうか。熟考を要する問題であらう。

それはさてをき次には2—3の常用の蛋白質に就いて、分子量を測定した結果を掲げて後に述べる論述の參考に供して見よう。

第2表 Serum-albumin の分子量

Author	Method	Molecular weight
Sørensen	Osmotic pressure	45000
Adair	"	62000
Adair	"	72000
Burk	"	74600
Svedberg	Sedimentation equilibrium	97500

表中(a)は水を、(b)はグリセリンを(c)は尿素を夫々溶媒とした時の實測値であつて(c)の場合は蛋白分子が二つに分割されたのだといふのである。
第2表と第3表に示した結果を通覽すれば Prof. Sørensen が報告

して居られる Serum-albumin

の分子量だけが、他の研究者の結果とちがつて居る丈であつて Serum-albumin にしても Haemoglobin にしても分子量の測定値は略々相等しくして大體に於て Prof. Svedberg が説かれ

第3表 Haemoglobin の分子量

Author	Method	Molecular weight
Adair	Osmotic pressure	67000
Northrop	Diffusion coefficient	68000
Burk	Osmotic pressure	71000(a)
"	"	66500(b)
"	"	34300(c)
Svedberg	Sedimentation equilibrium	68000

第4表 Ovalbumin の分子量

Author	Method	Molecular weight
Sørensen	Osmotic pressure	34000
Svedberg	Sedimentation equilibrium	34500
Burk	Osmotic pressure	36000
Folin	Tryptophan content	33186
"	Tyrosin content	34496
Osborne	Sulfide sulfur content	32660
"	Sulfur content	33728
Mc Bain	Diffusion coefficient	34000

る通り、34500の整數倍に近い値となつて居るのである。更に Ovalbumin に就ての分子量測定値を掲げて見れば第4表の通りである。

第4表をみれば Ovalbumin の分子量は研究者及び研究方法等がちがつても大體34000に近い數値になつて居る。従つて一

般専門學者には Ovalbumin の分子量は約34000であると信ぜられて居るのである。之が果して妥當なりや否なやについて一考を煩はして見よう。

D 考 察

改めて記述する迄もなく蛋白質は複雑なる構造を有する化合物であつて、其の行動は實に錯雜を極めて千變萬化であると云つてよいのである。例へば蛋白溶液の滲透壓は蛋白の濃度に比例

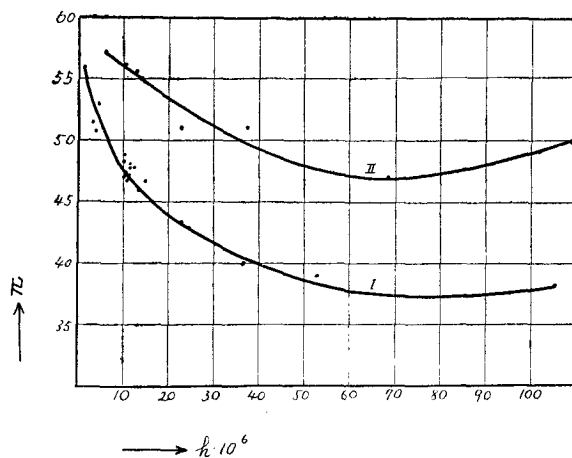
して變化することは勿論であるが、溶媒の種類並に水素イオン濃度等によつても著しく相違してくるのである。其の一例を示せば第一圖の通りである。

第一圖の縦軸は硫酸溶液 1 cc について Ovalbumin-N 1 mg equivalent が働き出す滲透壓 (π) を水壓にて示した cm 数である。而して横軸は水素イオンの濃度を示すのである。

圖中曲線 I は Ovalbumin の濃度が約 9% で硫酸の濃度が約 15% の時に水素イオン濃度を變化せしめた時の π の變化を示したものであり、曲線

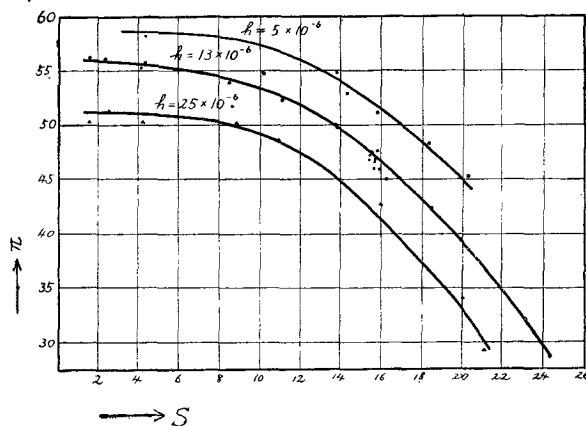
II は Ovalbumin の濃度が約 9% で硫酸の濃度が約 4% の時 π 即ち Ovalbumin の滲透壓に

第一圖
硫酸溶液内に於ける Ovalbumin の滲透壓に及ぼす水素イオンの濃度及硫酸の濃度の影響
(Prof. Sørensen による)



第二圖

硫酸溶液内に於ける Ovalbumin の滲透壓に及ぼす硫酸濃度の影響
(Prof. Sørensen による)



及ぼす水素イオン濃度の影響を示したのである。

即ち曲線 I にしても曲線 II にしても Ovalbumin の濃度も硫酸の濃度も夫々相等しくあつてもたゞ水素イオンの濃度が相違するだけで Ovalbumin の滲透壓が著しく相違することを示して居るのである。

第二圖の縦軸は硫酸溶液 1 cc につき存在する Ovalbumin-N 1 mg equivalent が働き出す滲透壓 (π) を水壓にて示した cm 数であり、又横

軸は硫酸の濃度を示したのであるが、それは水 100 g について溶存して居つた硫酸の g 数を S にて示したのである。

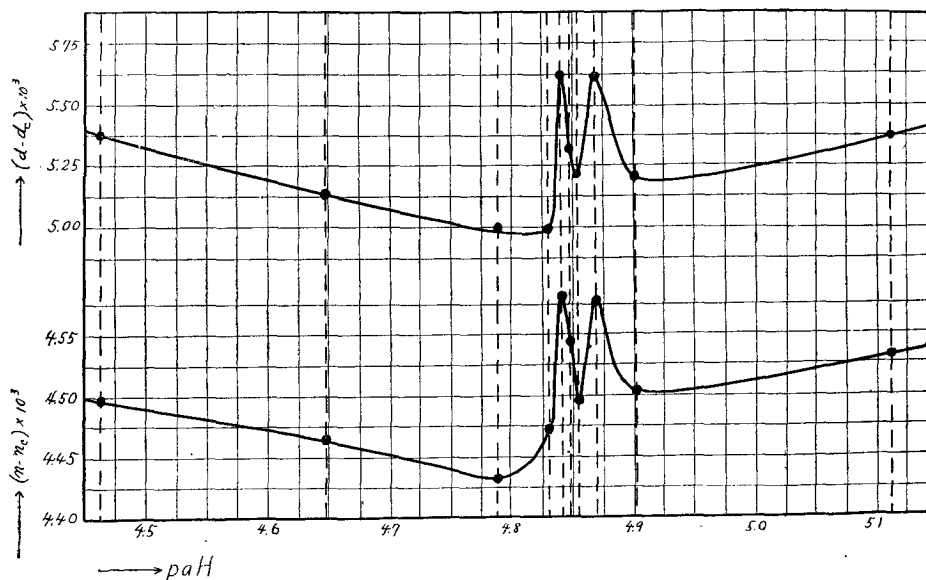
以上二圖によつて示された通り蛋白質の滲透壓は色々な條件によつて變化するのである。それは此の場合には Ovalbumin, 硫酸及び水素イオン等の濃度如何によつて Ovalbumin の状態が變化するからである。それほどに溶液中の蛋白質の状態は不安定なものである。

更に今一つの例をあげて溶液内の蛋白質の行動が如何に複雑であつて、而も可變性であること

を示して見よう。第三圖は硫酸の濃度が約 10%，Ovalbumin の濃度が約 2%である溶液について水素イオン活度をかへた場合に Ovalbumin の屈折率及び比重の變化を示したのであるが特に注目すべきことは蛋白が最も安定であると信ぜられて居る等電點附近に於てすら (Ovalbumin の等電點は pH 4.84 である) 屈折率も比重も著しく變動することである。

第三圖

硫酸溶液内の Ovalbumin の比重並に屈折率に及ぼす水素イオン活度の影響



以上に掲げた數例によつて、はゞ了解出来るやうに溶液内の蛋白が營む行動は千變萬化である。夫れ故に溶液内にて蛋白の單位量が働き出す眞の滲透壓を決定することは困難である (此處に云ふ眞の滲透壓とは外的條件の影響を受けて居らない滲透壓と云ふ意味である。)

Prof. Sørensen が Ovalbumin の分子量を計算されて、約 34000 であるとせられたのも其の計算の基礎になる數値は Section C に於て記述した通り $\pi = 65 \text{ cm}$ 水壓である。之は Ovalbumin の單位量が働き出す眞の滲透壓を意味するものであるが、測定値ではなくして Prof. Sørensen が多數の π の測定値 (此の π は色々な外的條件の影響を受けたもの) から想像して決定されたものである。従つて Ovalbumin の分子量が約 34000 であることは決定的の數値ではなく先生も亦附隨的に軽く報文に記載せられただけであつて、之を他の研究者等が自らの研究を有利に證據づける爲めに利用して居ることは、先生にとりては御迷惑も甚だしいことであらうかと私は考へて居るのである。

それのみならず滲透壓測定値から蛋白の分子量を算出する爲めに用ゐられた式は何れも理想氣體の狀態式 $pV = RT$ から誘導したものであつて稀薄溶液に對してのみ適用し得られること

は云ふ迄もない。然るに蛋白溶液は稀薄であつても、他の一般化合物の稀薄溶液の如き性質を示さないことは吾々の経験が教へるのである。従つて現在の所、滲透壓測定法によつて蛋白の分子量を算出することは大なる又多分の又根本的な誤りが介在すると考へられるのである。

又 Prof. Svedberg が採用された方法と計算に對しては蛋白の比重、粘度、摩擦力等が基礎となつて居るのである。然るに斯くの如き性質は著しく可變性のものである。このことは前記の實驗例によりても明瞭に了解出来るであらう。夫れ故に Prof. Svedberg が報告された蛋白の分子量は或る状態に於ける蛋白の見かけ上の分子量にすぎないのである。況んや同氏が蛋白分子量を算出する爲めに誘出された式

$$M = \frac{2 R \cdot T \ln \frac{C_1}{C_2}}{w^2 (1 - V \rho) (x_1 - x_2) (x_1 + x_2)} \quad (\text{Section B にて説明す})$$

は稀薄溶液に對してのみ適用し得られるのであることを思へば同氏が考案した實驗設備と其の理論は眞に尊敬に値することではあるが、それを以て蛋白の分子量を算出し得ると過信して自然界にある蛋白の分子量が 34500 の整数倍であると迄云ひ切つたことは蛋白の本來の性質を熟慮しなかつた爲めの謬論であると思ふ。

尙以上論述したことによつて滲透壓法と沈降平衡法とを應用して得た結果すらも蛋白の眞の分子量を示さないことを明かにしたわけである。思ふに此の方法と理論は精緻整然たるものであるが、それでも其の結果は前述の通り信を荷ひ難いものである。況んや其の他の方法それは理論に於ても操作に於ても不全なものであるが故に、其の結果も亦不全であることは此處に贅言を費す迄もないことである。

E 結 言

吾々の経験を以て判するならば現在取り扱はれて居る蛋白は眞の蛋白分子と糖類、類脂體、鐵、銅、亞鉛、アルミニウム等との集合體であらうと思へる。而して個々の蛋白分子は現在考へられて居るが程には大分子化合物でもなく又かほど迄に複雑した化合物でもなからうかと思はれるけれども、斯かるものが或る力即ち無機物の Valency か或は蛋白分子が持つ Residual Valency によつて集合するから複雑となり、又大分子化合物の如くに行動して其の行爲が錯雜となるのである。

微妙深淵にして又神祕的ともいふべき生命作用を荷ふ所の蛋白であるが故に、其の行爲が複雑にして又深淵であることは當然であるが、吾々はそれにも撓まず牛歩の如く遅々ではあるが一步一步なりとも神祕の扉を開いて遂には人生へ福利をもたらす爲めに努力を續けて居ることに些かなりとも理解と共鳴を得ればそれで吾々の苦心も亦充分に酬いられるのである。

(昭和 10 年 6 月 1 日化學研究所第 9 回講演會に於ける講演要領)